



Современный подход к диагностике пациентов с диагнозом рак легкого: новые маркеры в руках онкопатологов

Раскин Г.А.

Зав. отделением патологической анатомии МИБС,
д.м.н., проф. кафедры онкологии СПбГУ

19.11.2021

Москва

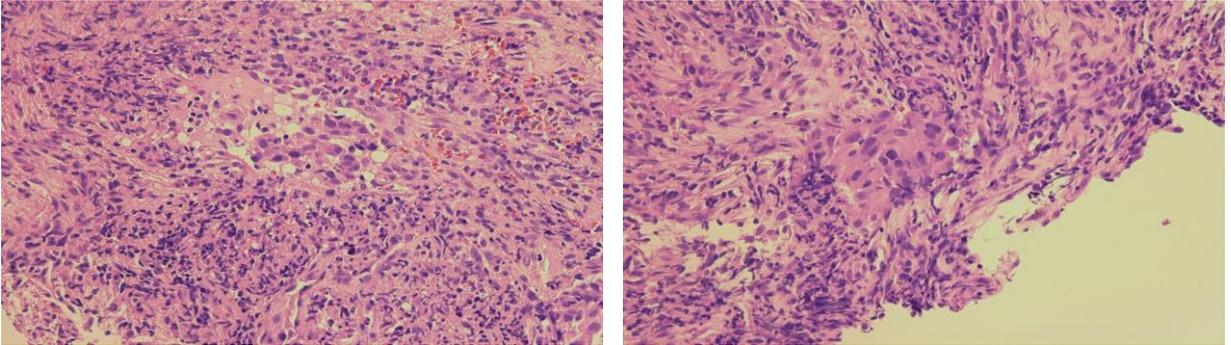
Иммуногистохимия в исследовании рака легкого

- Диагностическая: p63 (p40), TTF1. При необходимости: хромогранин А, синаптофизин, CD56, INSM1.
- ALK.
- ROS1 при необходимости дополняемая FISH-исследованием.
- PD-L1.
- NTRK.
- HER2.

Надо помнить, что помимо ИГХ, необходимы исследования EGFR, bRaf, c-met, RET.

Вопрос формулировки и интерпретации диагноза

Клинико-морфологическое наблюдение 1

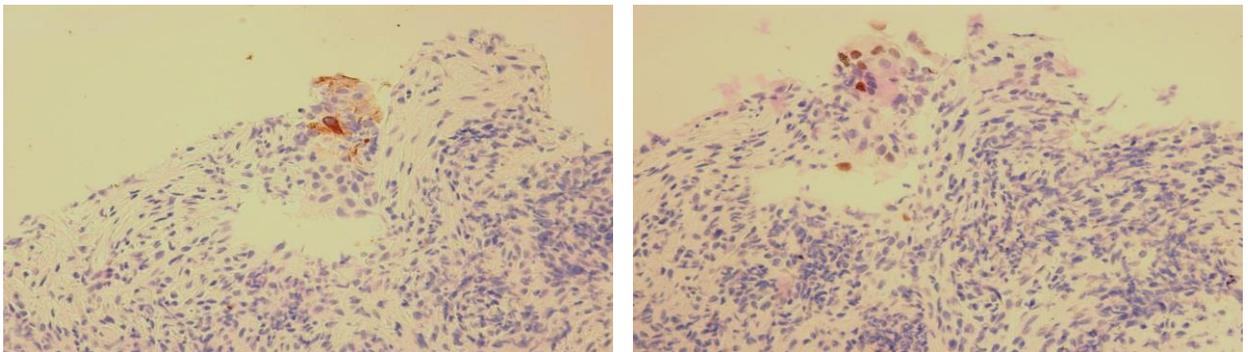


Диагноз региональной лаборатории: немелкоклеточный рак, наиболее вероятно, плоскоклеточный.
Последствия: пациента ведут как плоскоклеточный рак в течение двух лет.

Раскин Г.А., МИБС, 2021. Из личного архива

Вопрос формулировки и интерпретации диагноза

Клинико-морфологическое наблюдение 1



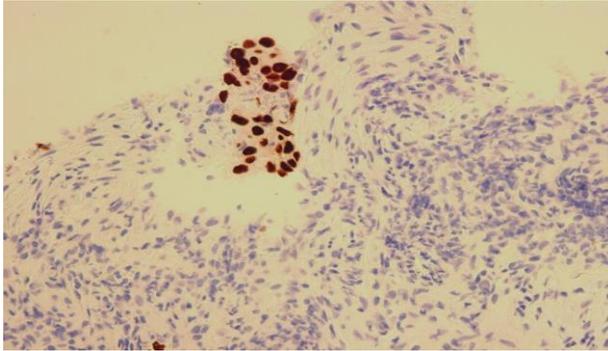
СКНМВ

p63

Раскин Г.А., МИБС, 2021. Из личного архива

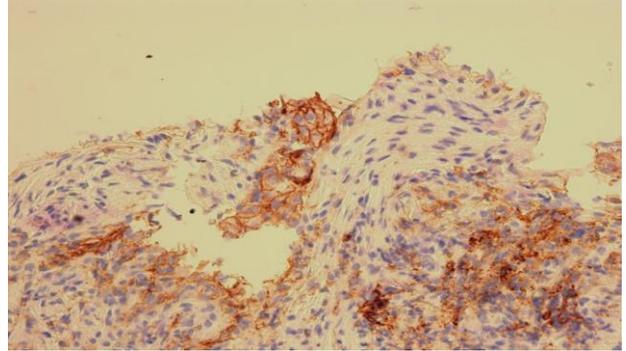
Вопрос формулировки и интерпретации диагноза

Клинико-морфологическое наблюдение 1



TTF1

Диагноз: аденокарцинома легкого



PD-L1

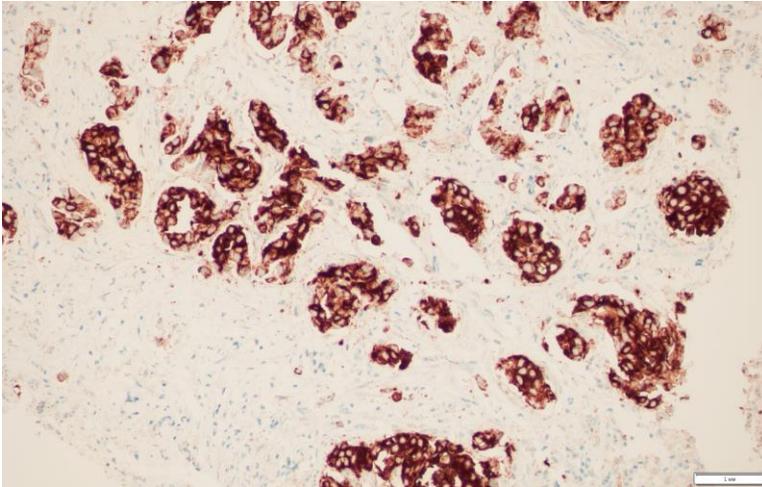
Раскин Г.А., МИБС, 2021. Из личного архива

Преимущества иммуногистохимии

- Врач-патологоанатом видит то, что он оценивает
- Быстрота, доступность, высокая достоверность и дешевизна исследований
- Оплачивается ОМС
- Преимущество иммуногистохимического определения ALK над всеми другими методиками.

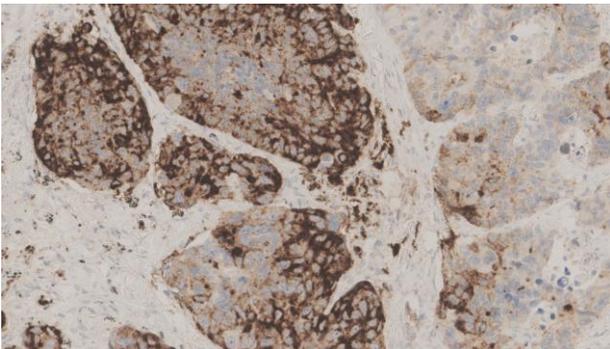
Раскин Г.А., МИБС, 2021. Мнение автора

Иммуногистохимическое исследование ALK (D5F3)

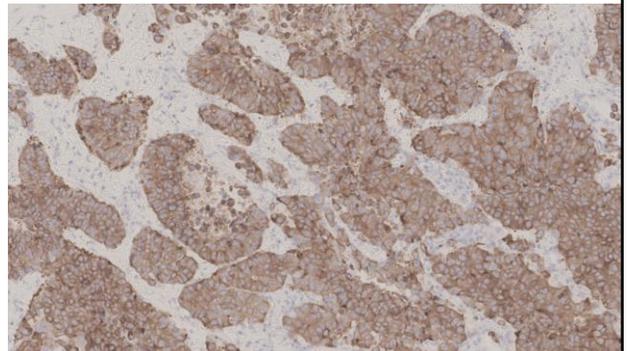


Раскин Г.А., МИБС.2021. Из личного архива

Иммуногистохимическое исследование ALK (D5F3). Ловушки.



ALK



Синаптофизин

Раскин Г.А., МИБС.2021. Мнение автора

Что такое ROS1?

ROS1 – это рецептор тирозинкиназы, относящийся к категории рецепторов инсулина¹.

При ROS1-положительном НМРЛ ген ROS1 на хромосоме 6 претерпевает внутривхромосомную или межхромосомную перестройку².

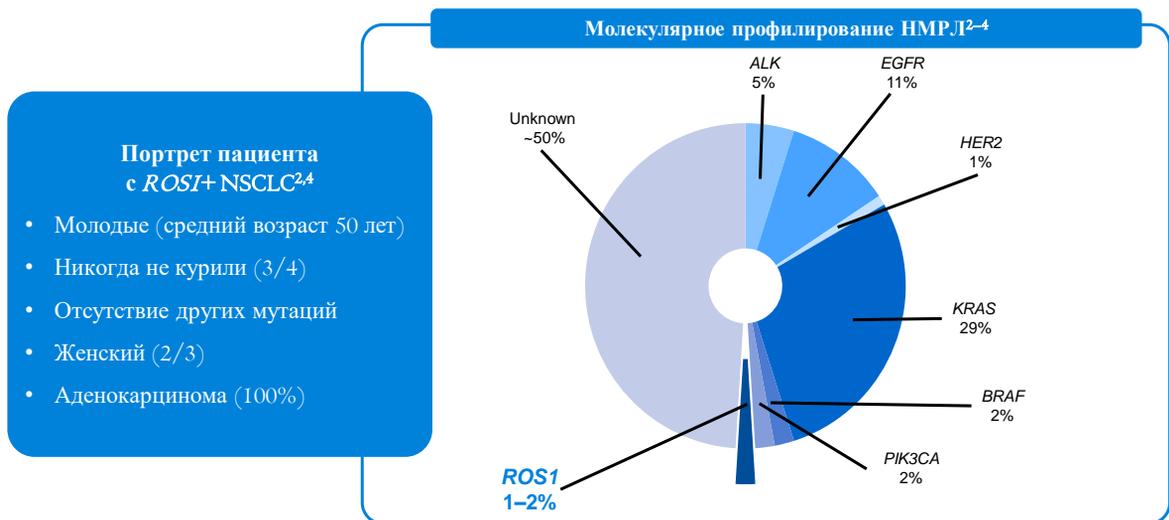


ROS1 слияния генов производят онкогенные белки³



¹BIRCHMEIER, ET AL. PROC. NATL. ACADEM. SCI. U.S.A. 1987; ²RIKOVA, ET AL. CELL. 2007; ³GAINOR & SHAW. ONCOLOGIST. 2013

ROS1 перестройки встречаются в 1–2% случаях НМРЛ¹



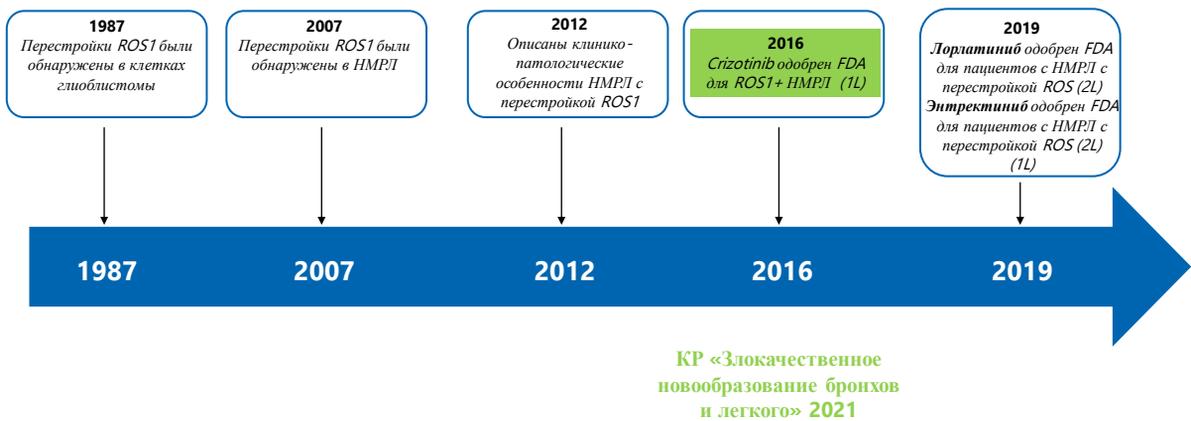
¹Bergethon, K. et al. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. J Clin Oncol. 2012;30:863-870; ²Lin & Shaw, J. Thor. Oncology 2017; ³Barlesi, et al. Lancet 2016; ⁴Bergethon, et al. J Clin Oncol 2012; ⁵Dagay, et al. Oncotarget 2017

Алгоритм диагностики рака легкого¹

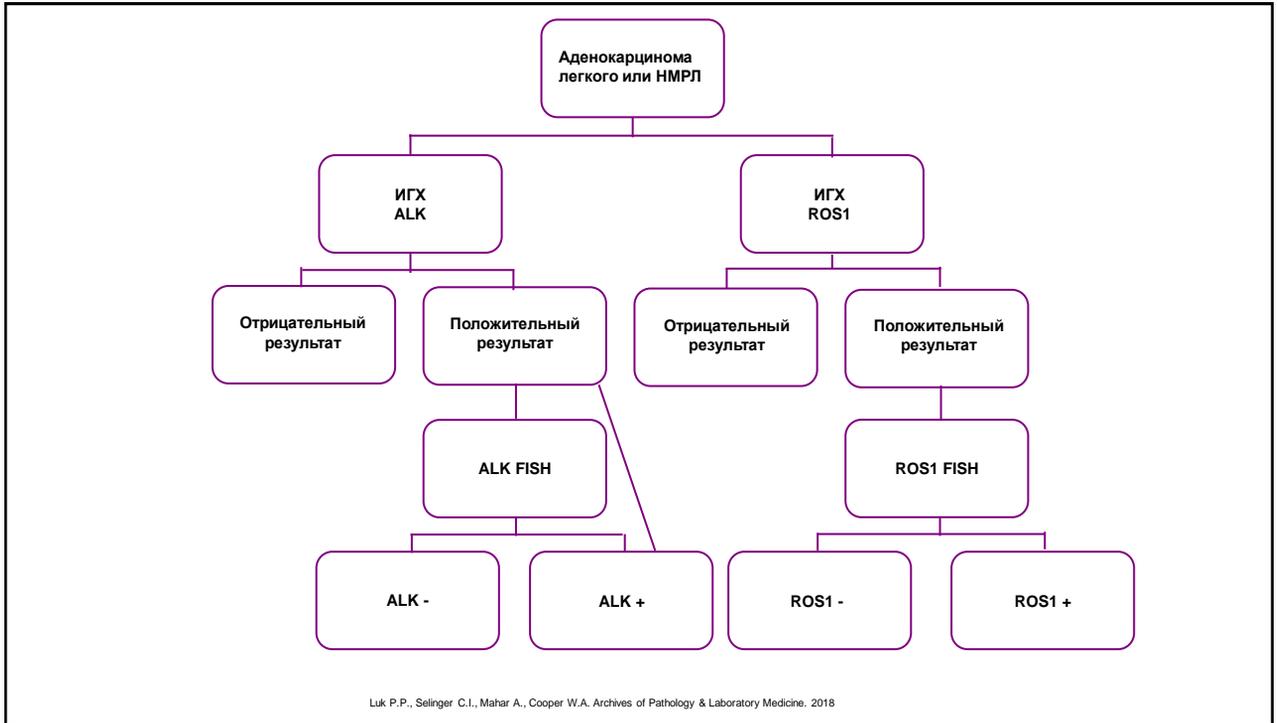


¹Рабочий процесс адаптирован на основе руководства Национальной всеобщей онкологической сети (NCCN, 2019)

Клиническая значимость: доступная терапия для ROS1



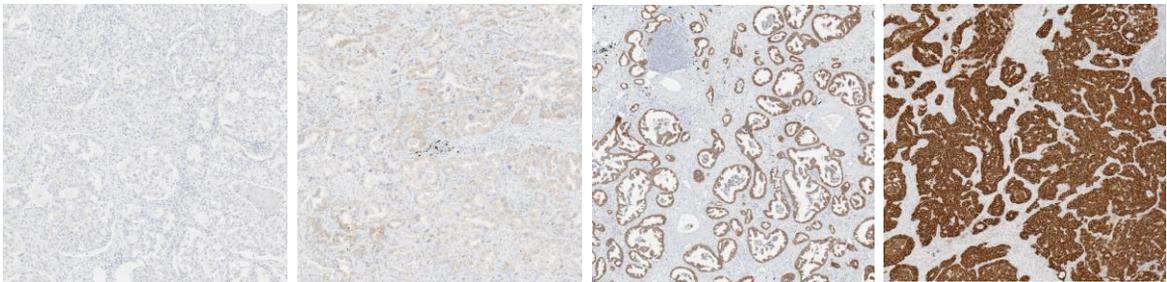
Adapted from Lin J & Shaw A. J Thorac Oncol 2017



ROS1 (SP384) тестирование

Примеры окрашивания

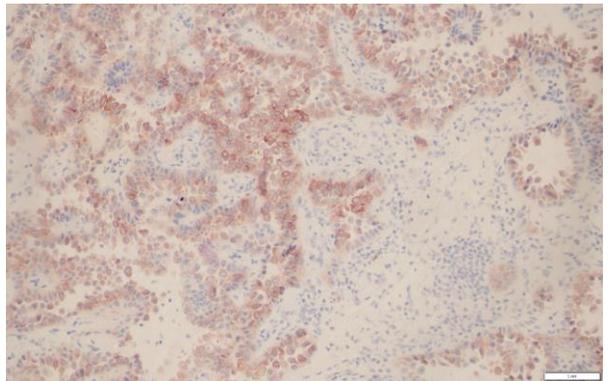
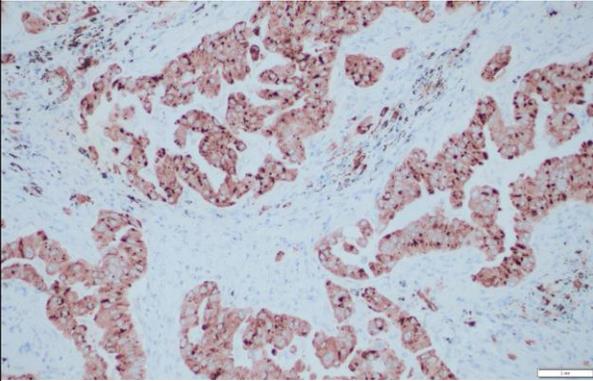
Окрашивание для анализа ROS1 (SP384) в основном цитоплазматическое, реже мембранное и ядерное.



Интенсивность окрашивания = 0 Интенсивность окрашивания = 1+ Интенсивность окрашивания = 2+ Интенсивность окрашивания = 3+

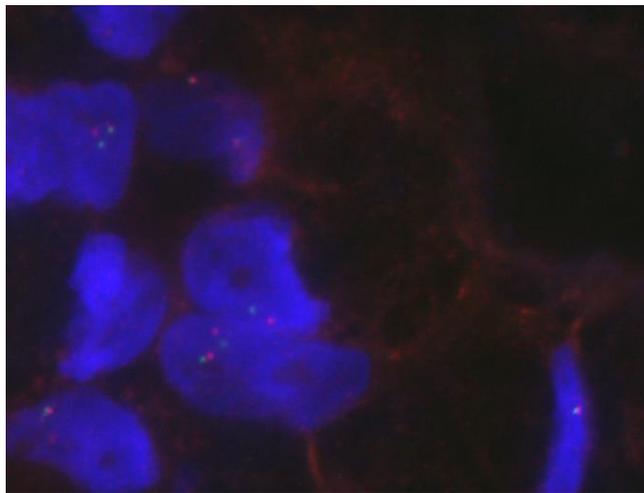
Анализ ROS1 (SP384) демонстрирует диапазон интенсивности цитоплазматического окрашивания в тканях NSCLC. Изображения сделаны с 4-кратным увеличением.

ROS1- позитивные случаи, подтвержденные FISH



Раскин Г.А., МИБС, 2021. Из личного архива

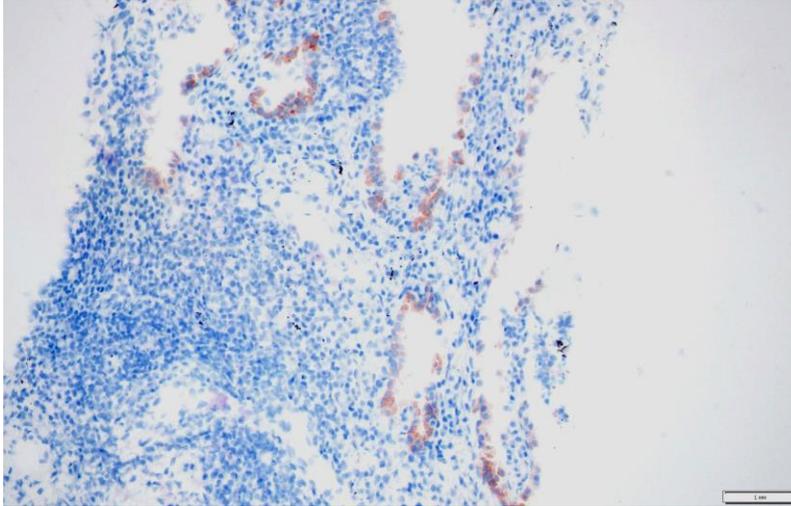
Аденокарцинома легкого с транслокацией ROS1 (FISH-исследование)



Раскин Г.А., МИБС, 2021. Из личного архива

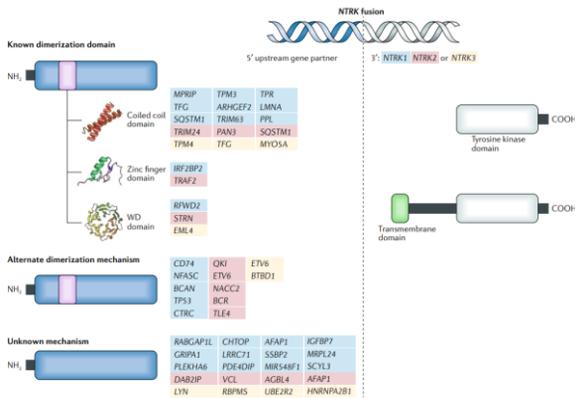


ROS1- позитивный случай иммуногистохимические, но без транслокации при FISH-исследовании.



Раскин Г.А., МИБС, 2021. Из личного архива

pan-TRK



Транслокации *NTRK* определяют чувствительность к TRK ингибиторам

Точковые мутации и амплификации не являются предикторами ответа

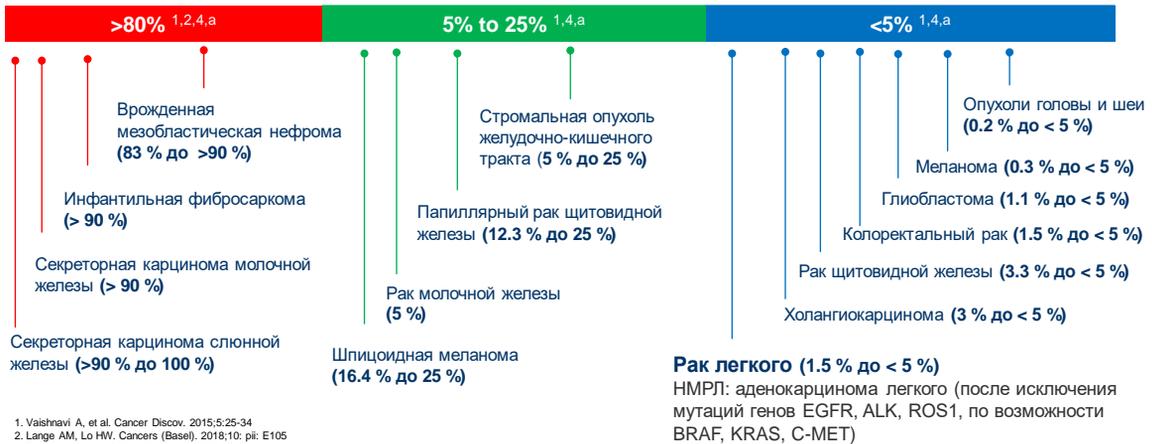
Иммуногистохимия определяет экспрессию белка, повышенную в результате транслокации

Наиболее часто используемый клон - EPR 17341, который связывается с С-концом белков TRKA, TRKB и TRKC, и подходит для выявления любых результатов слияния *NTRK*

Cocco E, Scaltriti M & Drilon A, Nature Reviews Clinical Oncol

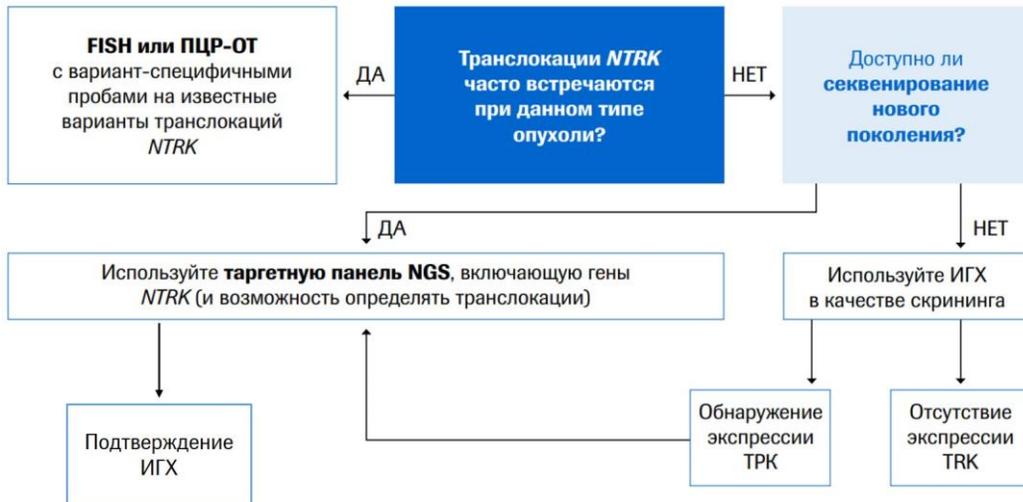
*определение транслокаций *NTRK* включено в рекомендации NCCN для немелкоклеточного рака легкого, колоректального рака, меланомы, MASC, опухолей из невыявленного первичного очага

Слияния генов **NTRK** наиболее часто встречаются в редких опухолях и редко встречаются в распространённых опухолях.



1. Vaishnavi A, et al. Cancer Discov. 2015;5:25-34
 2. Lange AM, Lo HW. Cancers (Basel). 2018;10: pii: E105
 4. Cocco E, et al. Nat Rev Clin Oncol. 2018;15:731-747
 * Tumor types for each prevalence block (>80%, 5% to 25%, and <5%) are organized according to their prevalence in descending order, from left to right.
 The location of each tumor type on each discrete frequency block is not indicative of its absolute (ie, raw) frequency.

Алгоритм тестирования ESMO



Reis-Filho JS. Detecting MSI and TRK fusion using NGS: ESMO recommendations (2018). Presented at ESMO Congress 2018. NTRK Testing Guidance (adjusted from ESMO proposal)

Сравнение методов исследования транслокаций *NTRK*

	Иммуногистохимия (ИГХ)	Флюоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH)	Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	Секвенирование нового поколения (NGS)
Плюсы	<ul style="list-style-type: none"> Высокая чувствительность Низкая стоимость^{1,2} Доступность³ Время - дни⁵ Мало материала 	<ul style="list-style-type: none"> Высокая чувствительность и специфичность⁷ Доступность Время – дни Выявляет новые транслокации (break-apart пробы) 	<ul style="list-style-type: none"> Высокая чувствительность и специфичность^{3,8} Низкая стоимость¹ Доступность Время-дни Мало материала 	<ul style="list-style-type: none"> Потенциально высокая чувствительность и специфичность¹ Мультиплекность – анализ многих маркеров¹
Минусы	<ul style="list-style-type: none"> Низкая специфичность³ Нет стандартизованных алгоритмов оценки¹ 	<ul style="list-style-type: none"> Много ткани (3 среза) Высокая стоимость 	<ul style="list-style-type: none"> Не выявляет новые транслокации⁹ 	<ul style="list-style-type: none"> Дорогой Время-недели⁶ Централизация (НМИЦ и референсные лаборатории)⁹ Некоторые требуют много ткани

NTRK, neurotrophic tyrosine receptor kinase; TRK, tropomyosin receptor kinase

1. Bubendorf L et al. Virchows Arch 2016;469:489-503; 2. Doshi S et al. Diagnostics 2016;6:4; 3. Bourgeois JM et al. Am J Surg Pathol 2000;24:937-46; 4. <https://www.cms.gov/apps/physician-fee-schedule/search/search-results.aspx?T=0&T=0&C=T&H=1&S342&M=1>; 5. Data from Diagnostics Laboratory Database; 6. Kerr KM, Lopez-Rios F. Ann Oncol 2016;27(11):16-24; 7. Cui C et al. Front Cell Dev Biol 2016;4(1-11); 8. Argani P et al. Mod Pathol 2000;13:29-36; 9. Church AJ et al. Mod Pathol 2017;30(11):2172-7; 10. Kwang Chae Y et al. Oncotarget 2017;8(10):9865-88; 11. Drilon A et al. N Engl J Med 2018;378:731-8; 12. <https://www.aacr.org/publications/drivelines/2015/may/new-generation-sequencing-in-the-clinical-laboratory>; 13. Paasinen-Sohns A et al. Neoplasia 2017;19:196-206; 14. Data from Diagnostics PayerLandscape Database; 15. <https://neogenomics.com/test-menu/ngs-alk-ntrk-ret-ros-1-fusion-profile>; 16. Tannenbaum-Dvir S et al. Cold Spring Harb Mol Case Stud 2015;1:a000471

Сравнение методов исследования транслокаций *NTRK*

ORIGINAL ARTICLE

Pan-Trk Immunohistochemistry is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of *NTRK* Fusions

Jaclyn F. Hechtman, MD,* Ryma Benayed, PhD,[†] David M. Hyman, MD,[‡] Alexander Drilon, MD,[‡] Ahmet Zehir, PhD,* Denise Frosina, BS,* Maria E. Arcila, MD,* Snjezana Dogan, MD,* David S. Klimstra, MD,* Marc Ladanyi, MD,* and Achim A. Jungbluth, MD*

Modern Pathology (2020) 33:38–46
<https://doi.org/10.1038/s41379-019-0324-7>

ARTICLE

NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls

James P. Solomon¹, Irina Linkov¹, Andrea Rosado¹, Kerry Mullaney¹, Ezra Y. Rosen², Denise Frosina¹, Achim A. Jungbluth¹, Ahmet Zehir³, Ryma Benayed⁴, Alexander Drilon^{5,6,7}, David M. Hyman^{8,9}, Marc Ladanyi¹, Anthony N. Sirota¹, Jaclyn F. Hechtman¹

USCAP

www.nature.com/modpathol

REVIEW ARTICLE

NTRK insights: best practices for pathologists

Jaclyn F. Hechtman¹⁰

© The Author(s) 2021

Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of *NTRK* Fusions. Am J Surg Pathol. 2017;41(11):1547-1551. doi:10.1097/PAS.0000000000000911

Solomon JP, Linkov I, Rosado A, et al. *NTRK* fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. Mod Pathol. 2020;33(1):38-46. doi:10.1038/s41379-019-0324-7

<https://doi.org/10.1038/s41379-021-00913-8>

21 опухоль с наличием транслокации в генах *NTRK* и 20 опухолей без Транслокации. Чувствительность и специфичность для ИГХ метода – 95,2 % и 100 % соответственно.

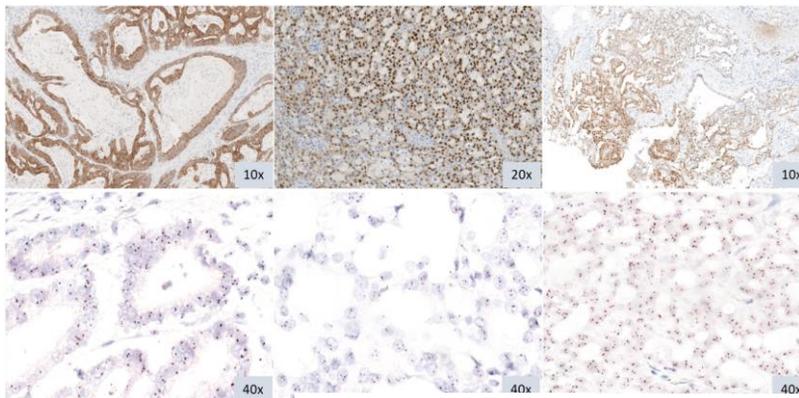
Чувствительность и специфичность для ИГХ метода - 87,9 % и 81,1 % соответственно (*NTRK1* – 96 %, *NTRK2* – 100 %, *NTRK3* – 79 %).

Pan-TRK – клон EPR17341

- Позитивным считается окрашивание хотя бы 1% опухолевых клеток*
- Локализацию экспрессии TRK в клетке, отличную от нативной цитоплазматической, обеспечивает партнер слияния (около 25)
- Корреляция между локализацией окрашивания и вариантом партнера**
- Чувствительность иммуногистохимического метода к выявлению слияний *NTRK3* ниже чем для *NTRK1* и *NTRK2* (79% против 96% и 100% соответственно)*/**

Webinar "Exchange NTRK experience" Prof. Dr. David Creyten, MD, PhD Pathologist, Head of Clinic Professor of Pathology Soft Tissue and Bone Pathology, Pediatric oncopathology, Head&Neck Pathology, Dermatopathology Ghent University Hospital, Ghent University
 *Gatalica Z, Ziu J, Swensen J, et al. Mod Pathol 2019;32:147-153; **Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, et al. Am J Surg Pathol 2017;41:1547-1551; ***Solomon JP, Linkov I, Rosado A, et al. Mod Pathol 2020;33:38-46

Pan-TRK – клон EPR17341



Ткань коры головного мозга или мозжечка - внешний контроль, периферические нервы (при наличии в строме) – внутренний контроль, а нормальные ткани (кровеносные сосуды, кожа, воспалительные клетки) – как негативный внутренний контроль

Колоректальный рак (10x)

Окрашивание ОК- 98%
 ISH break apart – 40%
NTRK1
 NGS – TPM3-*NTRK1*

MASC (20x)

Окрашивание ОК - 95%
 ISH break apart – 52%
NTRK3
 NGS – ETV6-*NTRK3*

Протоковая карцинома

поджелудочной железы (10x)
 Окрашивание ОК - 35%
 ISH break apart – 73% *NTRK3*
 NGS – не выполнялся

Images are proprietary to Ventana Medical Systems, Inc; www.roche.com www.ventana.com © 2018 Ventana Medical Systems, Inc. VENTANA and the VENTANA logo are trademarks of Roche. All other trademarks are the property of their respective owners. ОК – опухолевые клетки

Современные вызовы в PD/PD-L1 диагностике*

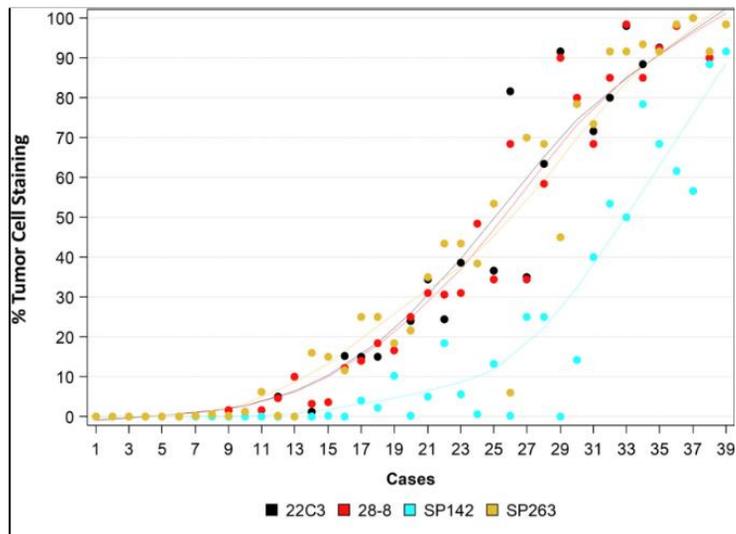
1. Обычно оценивают только 0,001% объёма опухоли (при резекции образца ~5 см в диаметре).
2. Экспрессия PD/PD-L1 гетерогенна:
 - В различных участках одного и того же образца опухоли;
 - В образцах из различных участков опухоли.
3. Сегодня существует не менее 12 анти-PD-L1-антител (из них не менее 4 могут быть использованы при НМРЛ):
 - Разные антитела связываются с разными участками рецептора;
 - Существуют разные варианты антител (рекомбинантные и поликлональные).
4. Конкордантность при использовании различных клонов не всегда повторяема.
5. Возможна неправильная оценка результата в связи с дефектами фиксации, проводки препаратов, либо особенностями организма пациента.

* McLaughlin J, Han G, Schalper KA, et al. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. JAMA Oncol. 2016;2(1):46-54.

Антитела для оценки экспрессии PDL1

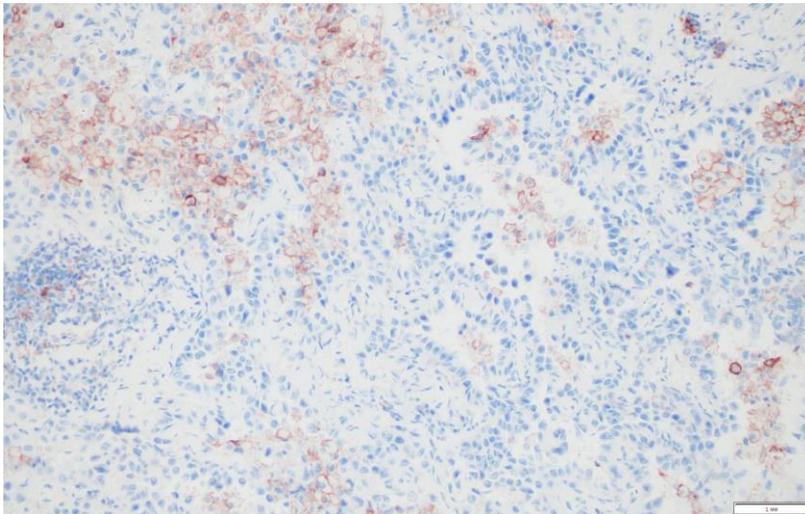
Тест	SP263	22C3	28-8	73-10	SP142
ИО препарат	Дурвалумаб	Пембролизумаб	Ниволумаб	Авелумаб	Атезолизумаб
Порог детекции	Рак легкого: TPS \geq 1%; \geq 50%. Другие локализации: CPS \geq 1%; \geq 10%.	Рак легкого: TPS \geq 1%; \geq 50%. Другие локализации: CPS \geq 1%; \geq 10%.	\geq 1%; \geq 5%; \geq 10% опухолевых клеток	\geq 1% опухолевых клеток	Рак легкого: IC (иммунные клетки) \geq 10%, TC (опухолевые клетки) \geq 50%

Конкордантность различных анти-PD-L1 систем



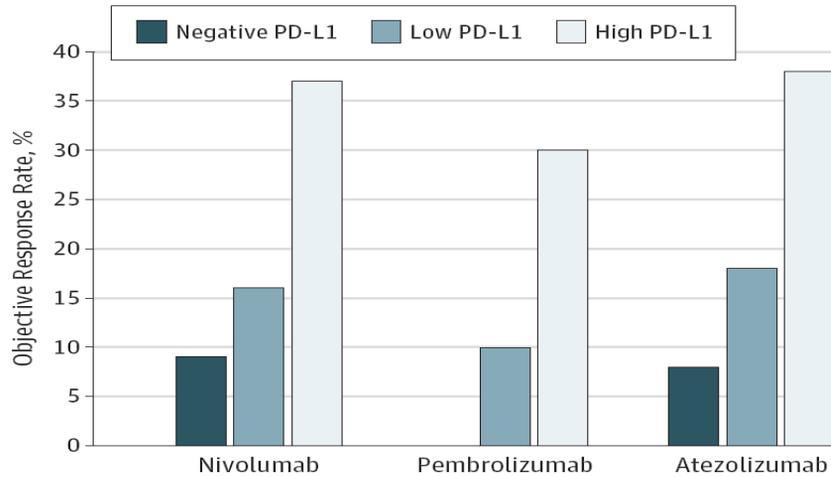
Fred R.Hirsch et al., 2017

Почему иммуногистохимия, а не ПЦР?



Раскин Г.А. МИБС. 2021. Из личного архива

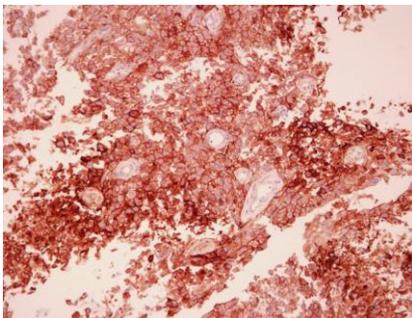
Предиктивное значение PD-L1 в НМРЛ



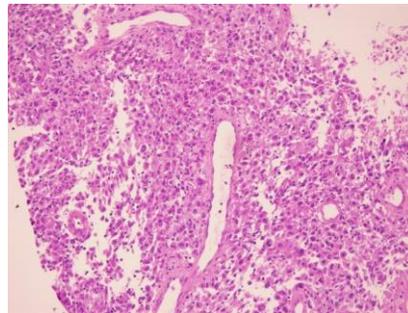
Sacher A.G., Gandhi A.G. JAMA Oncology, 2016

ИГХ PD-L1 при саркоматоидном раке легкого (n=15)

- В 10 из 15 случаев была выявлена экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках >50% (TC3).

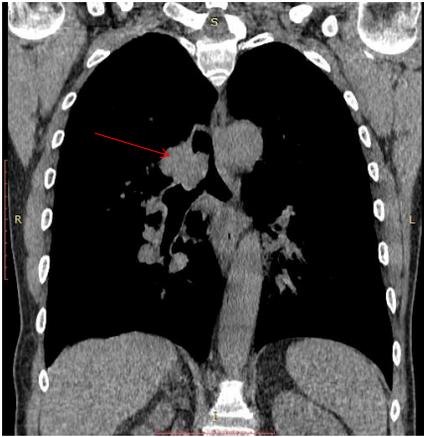


PD-L1

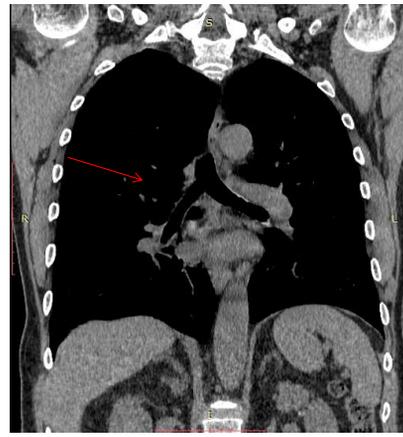


Андабеков Т.Т., Раскин Г.А. 2021. Собственные данные

Анти-PD1 терапия при саркоматоидном раке



До лечения

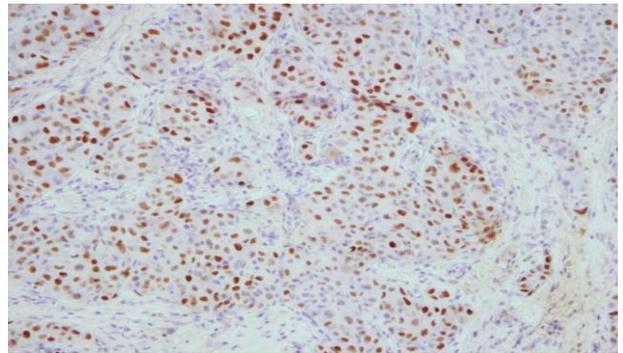
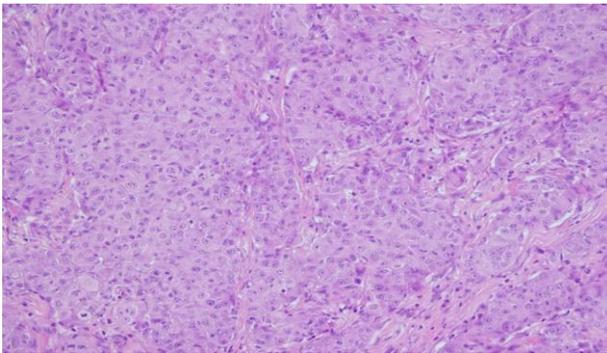


После лечения

Андабеков Т.Т., Раскин Г.А. 2021. Собственные данные

Последовательность исследований PD-L1, EGFR, ALK, ROS1

Клинико-морфологическое наблюдение 2



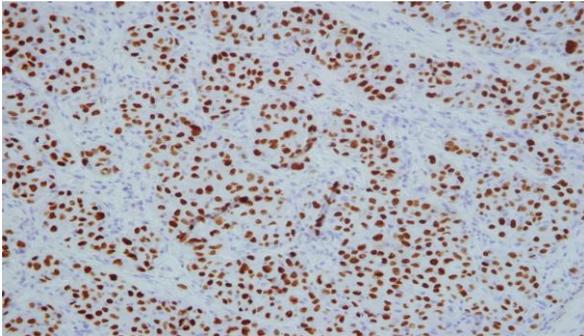
p63

Пациент, 16 лет, мужчина, образование средостения. Поступил на пересмотр с диагнозом миеоэпителиальный рак.

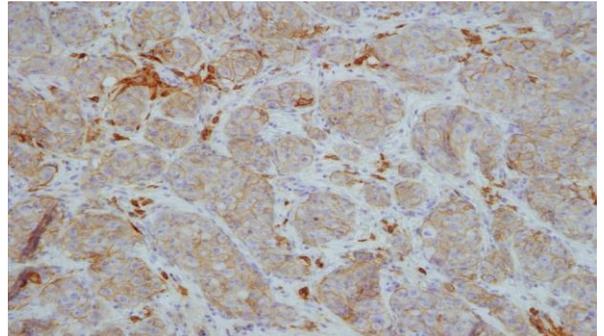
Раскин Г.А., МИБС, 2021. Из личного архива

Последовательность исследований PD-L1, EGFR, ALK, ROS1

Клинико-морфологическое наблюдение 2



TTF1



PD-L1

Диагноз: аденокарцинома легкого солидного типа

Раскин Г.А., МИБС.2021. Мнение автора

Клинико-морфологическое наблюдение 2

- У пациента выявлена транслокация ALK
- Была назначена анти-ALK терапия
- Опухоли с активирующими мутациями EGFR, транслокациями ALK, ROS1 мало чувствительны к анти-PD(L)1-терапии

Раскин Г.А., МИБС.2021. Из личного архива

Последовательность исследований

В настоящее время принято локальное решение в рамках учреждения на одномоментное выполнение исследования всех предиктивных маркеров при неплоскоклеточном НМРЛ: EGFR, ALK, ROS1, BRAF, PD-L1*.

***Возможно за счет средств ОМС.**

Раскин Г.А., МИБС.2021. Мнение автора

Резюме:

- В настоящее время недостаточно только поставить диагноз. Необходимо охарактеризовать опухоль, используя предиктивные маркеры, которых с каждым днем становится все больше и больше.
- В условиях дефицита материала бронхобиопсий необходимо тщательно следить за расходом каждого среза с опухолью.
- Несмотря на стремительное развитие молекулярно-генетических методик (NGS) морфологические методы исследования (ИГХ, FISH) сохраняют свое значение в характеристике опухолевого процесса.